

Ösztrogén recepció és funkció a GnRH szekréciót szabályozó idegi hálózatban

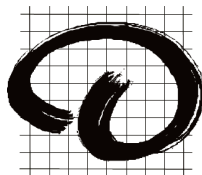
Doktori értekezés tézisei

Vida Barbara

MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet
Endokrin Neurobiológiai Kutatócsoport

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Biológia Doktori Iskola, Idegtudomány és
humánbiológia program

Iskolavezető: Dr. Erdei Anna, akadémikus
Programvezető: Dr. Détári László, egyetemi tanár



Témavezető: Dr. Kalló Imre tudományos főmunkatárs, Ph.D.

Konzulens: Dr. Liposits Zsolt egyetemi tanár, Ph.D, D.Sc.

Budapest, 2011

Bevezetés

A hipotalamo-hipofizeo-gonadális (HHG) tengelyének központi vezérlő egységét a gonadotropin-releasing hormont termelő (GnRH) neuronok képezik. Rágcsálókban a tengely szabályozása jelentős nemek közti eltérést mutat, és az emberi reprodukciós rendszer szabályozásával összehasonlítva is számos különbségre fény derült. Általánosságban elmondható, hogy az ösztrogén kis mennyiségben gátolja, nagy mennyiségben pedig serkenti a tengely működését, és a GnRH neuronok működését direkt illetve indirekt úton is befolyásolja. Az ösztrogén-hatások jelentős részét nukleáris ösztrogén receptorok (ER α és ER β) közvetítik. Ezek közül *in vivo* csak az ER β detektálható a GnRH neuronokban, mely a génexpresszióra gyakorolt hatásai mellett nemgenomikus, azonnali hatások közvetítésében is részt vesz. Az ösztrogén neuroprotektív hatása, hasonlóan a központi idegrendszer más neuronhálózataiban megfigyeltékhez, ER β -n keresztül a GnRH neuronokban is érvényesülhet. Ezzel ellentétben úgy tűnik, hogy az ER β -n keresztül létrejövő hatások a szexuális érés, és szaporodás centrális szabályozásában nem töltenek be nélkülözhetetlen szerepet. Az ER α szerepe ebben a vonatkozásban azonban elengedhetetlen, ugyanis a GnRH szekréció szabályozásában az ösztrogén negatív illetve pozitív visszacsatolás mediátoraként ez az altípus vesz részt. Mindebből következik, hogy a GnRH neuronokra történő visszacsatolás indirekt úton valósul meg, nagy valószínűséggel olyan neuronok segítségével, melyek beidegzik a GnRH idegsejteket és ER α -t expresszálnak. Az eddigi adatok szerint a pozitív visszacsatolás a rostrális periventrikuláris régió (RP3V) neuronjainak közbeiktatásával valósul meg, a negatív pedig az arcuatus magon (ARC) keresztül történik. A reprodukciós rendszer megfelelő működésének az ösztrogén szignál GnRH neuronokhoz való továbbítása azonban csak szükséges, de nem elégséges feltétele. Rágcsálókban ehhez még a szuprakiazmatikus magból (SCN) származó cirkadián információnak is társulnia kell, így az ovulációt megelőző GnRH/LH surge a ciklus megfelelő napján a sötét napszak kezdetekor következik be. Mivel a SCN fő efferenseit a vazopresszin (VP) és a vazóaktív intesztinális polipeptid (VIP) tartalmú rostok adják, a vizsgálatok zöme abból a feltételezéséből indult ki, hogy ezek közvetítik az LH surge kiváltásához szükséges cirkadián információt. A vizsgálatokból származó eredmények viszont ellentmondások, egyrészt a VP közvetítő szerepét támasztják alá, másrészt a VIP elsődleges szerepére utalnak. Ezen felül fajbéli különbségek is megfigyelhetők;

míg a patkányokon végzett vizsgálatok azt mutatják, hogy a szuprakiazmatikus bemenet közvetlenül is elérheti a GnRH neuronokat, egerekben az adatok inkább arra utalnak, hogy a cirkadián jel egy, az RP3V-ben elhelyezkedő köztes neuronpopuláción keresztül teszi ezt, ami az ösztrogén és a cirkadián szignál integrációját teszi lehetővé.

Alig tíz éve került a neuroendokrinológiai kutatások reflektorfényébe a kisspeptin (KP), melyről számos kísérleti adat tette nyilvánvalóvá a reprodukciós tengely szabályozásában betöltött kulcsfontosságú szerepét. Az eddigi eredmények szerint a KP a GnRH pulzatilis és surge jellegű felszabadulását is irányítja. Rágcsálókban KP neuronok két kitüntetett régióban, az RP3V-ben és az ARC-ban helyezkednek el. Az eddigi adatok alapján megállapítható, hogy az előbbi KP sejtcsoport az ösztrogén pozitív, míg az utóbbi a negatív visszacsatolás közvetítésében vesz részt. A KP-en kívül ezekben a régiókban más neuropeptidek is termelődnek (galanin, neurokinin B, dynorfin, enkefalin), melyek GnRH neuronokra kifejtett hatását eddig csak egymástól függetlenül vizsgálták. A kutatások nemrég terjedtek ki abba az irányba, hogy megállapítsák, miként működhetnek közre egymással ezek a peptidek a GnRH szekréció szabályozásában.

Célkitűzések

1. Szelektív és nem szelektív ösztrogén receptor agonisták protektív hatásának *in vitro* vizsgálata oxidatív stresszel szemben.
2. A KP neuronok cirkadián információt közvetítő szerepének morfológiai vizsgálata hím és nőstény egerekben.
3. KP immunreaktív (IR) neuronok és GnRH idegsejteken lévő terminálisaik fenotípusának vizsgálata.
4. A KP rendszer morfológiai jellemzése humán hipotalamuszban.

Alkalmazott módszerek

Állatok

Állatkísérleteinket CD1 hím és nőstény egerek (CD1 törzs, 25-30g súly, MTA KOKI Orvosi Géntechnológiai Részlege), a humán vizsgálatainkat pedig Semmelweis Egyetem Igazságügyi és Biztosítás-orvostani Intézetétől kapott férfi és női hipotalamusz blokkok felhasználásával végeztük.

Sejtenyésztés

Immortalizált, GnRH-szekretáló GT1-7 sejteken 24 órás 17β -ösztradiol illetve szelektív ER aginosták kezelését követően vizsgáltuk, hogy ezek megakadályozzák-e a sejtekben az oxidatív stressz ($100\mu\text{M}$ H_2O_2 kezelés 50 percig) hatására fellépő mitokondriális membrán potenciál ($\Delta\Psi_m$) csökkenést. Az agonisták 10pM -os koncentrációját alkalmaztuk, a $\Delta\Psi_m$ változását a kationos, lipofil DIOC6 sejtekhez adásával mutattuk ki, mely a Nerst egyenletnek megfelelően elsősorban a mitokondriumokban halmozódik fel, a mitokondriumok depolarizálódásával viszont lecsökken a sejtben belüli felhalmozódása.

Anterográd pályajelölés

A SCN-ből eredő rostok és az RP3V-ben található KP neuronok kapcsolatának morfológiai vizsgálatához ovariectomizált (OVX), ösztrogénnel kezelt CD1 nőstény egerek SCN-jába anterográd pályajelölő anyagot, Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L) juttattunk sztereotaxikus műtét során iontoforézissel. Az állatokat 7 napos túlélés után transzkardiálisan perfundáltuk. A PHA-L-t a beadási gócban és a transzport helyén egyes immunhisztokémiai jelöléssel mutattuk ki.

Többes immunfluoreszcens jelölés, képelemzés konfokális mikroszkóp segítségével

1. PHA-L beadást követően vizsgáltuk az RP3V-ban elhelyezkedő KP neuronokon a PHA-L/VP illetve PHA-L/VIP kettősen jelölt appozíciókat annak bizonyítására, hogy a VP- és VIP-tartalmú afferensek a SCN-ből erednek.
2. A KP sejteken végződő VP rostok SCN eredetének bizonyítására és a beidegzés mértékének megállapításához abból az irodalmi adatból indultunk ki, hogy a szuprakiazmatikus VP neuronok, ellentétben az agy egyéb területein lévővel,

galanint nem termelnek. Konfokális elemzéseket végeztünk nőtény és hím egerekből származó metszeteken, melyekben a VP, KP és galanin antigéneket együttesen mutattuk ki. Megállapítottuk, hogy az SCN eredetű, vagyis galanin-immunnegatív, VP-IR appozíciók milyen számban találhatóak a KP-IR neuronokon.

Ahhoz, hogy megállapítsuk, az ösztrogén milyen hatással van erre a neuronális kapcsolatra, az elemzéseket a nőtények három kezelési csoportján végeztük el: intakt, diösztrusz állapotban lévőkre (a megfelelő fázist hüvelykenet sejtanálízissal és a hüvely nyálkahártya ellenállásának mérésével azonosítottuk); OVX, sc. kapszulában lévő olajban oldott ösztrogénnel kezeltre (OVX+E2 csoport) és OVX, sc. kapszulában lévő olajjal kezeltre (OVX+olaj csoport). Ugyanezen állatokban kettős immunfluoreszcens jelölést követően vizsgáltuk, hogy a KP neuronokon szintén megfigyelhetők-e a nagy valószínűséggel szuprakiazmatikus eredetű VIP-IR kontaktusok.

3. A KP sejtek neurokémiai altípusainak elkülönítésére OVX+E2 kezelési csoportba tartozó egereken vizsgáltuk, hogy a KP neuronok az RP3V-ben tartalmazznak-e galanint illetve neurokinin B (NKB)-t. OVX+olaj nőtényekben ugyanezt vizsgáltuk az ARC KP neuronjaiban. A kezelési csoport-régió párosítást az indokolja, hogy a KP expresszió erős ösztrogénfüggőséget mutat, míg a RP3V-ben magas ösztrogén szint, addig az ARC-ban alacsony ösztrogén-szint eredményez maximális mRNS szintet illetve immunreaktivást. A neuropeptidek perikariális kimutathatóságának növelése érdekében az állatok az oldalkamrájukba 40µg kolhicint is kaptak.

A GnRH neuronokkal kontaktust képező KP-IR afferensek galanin és NKB tartalmának meghatározásához az OVX+E2 és OVX+olaj állatok metszeteiben a GnRH, KP és galanin vagy NKB immunfluoreszcens detekálása után konfokális elemzéssel vizsgáltuk a KP-IR appozíciók galanin illetve NKB immunreaktivását.

4. Női mintákon vizsgáltuk kettős immunfluoreszcens jelölés után, hogy a rágszáló RP3V-nek megfelelő periventrikuláris (Pe) és az ARC-nak megfelelő infundibuláris mag (Inf) területén a KP-IR sejtestek és rostok hány százaléka tartalmaz NKB-t.

Kettős immunhisztokémiai jelölés, elemzés elektronmikroszkóp segítségével

Egerekben megvizsgáltuk, hogy a KP sejteken detektált VP-IR kontaktusok illetve a GnRH neuronokon lévő KP appozíciók szinaptikus kapcsolatot jelentenek-e. A diaminobenzidinnel (DAB)-jelölt KP sejteken lévő ezüst-arany intenzifikált Ni-DAB-nel jelölt VP-IR kontaktusok ultrastrukturáját elektronmikroszkóppal vizsgáltunk. Ugyanezt a technikát alkalmaztuk a GnRH sejtek és KP terminálisok közti szinapszisok kimutatásához is.

Egyes és kettős immunhisztokémiai jelölés, elemzés fénymikroszkóp segítségével

A KP-IR struktúrák humán hipotalamuszban történő térképezéséhez férfi és női hipotalamikus mintákon egyes jelöléssel a KP immunoreaktivitást mutattunk ki. A GnRH és KP idegsejtek morfológiai kapcsolatának vizsgálatához KP-IR rostok GnRH neuronokkal kialakított kontaktusait kettős jelöléssel azonosítottuk.

Kvantitatív kettős *in situ* hibridizáció

Galanin és KP mRNS-t mutattunk ki az RP3V és az ARC neuronjainak neurokémiai jellemzéséhez. Digoxigeninnel jelölt KP és a ³⁵S izotóppal jelölt próbák felhasználásával OVX+E2 egerekben az RP3V-ben, OVX+olaj egerekben pedig az ARC-ban vizsgáltuk, hogy a KP neuronok hány százalékában található galanin mRNS.

Statisztika

Fénymikroszkópos adataink statisztikai elemzéséhez egy-utas ANOVA analízist használtunk ($p < 0.05$ szignifikancia szint mellett). Adatainkat átlag \pm SEM formában adtuk meg.

Eredmények

1. Oxidatív stressz hatására a GT1-7 sejtekben jelentősen lecsökkent az elsősorban mitokondriumokban felhalmozódó DIOC6 mennyisége, ezt a sejtek területére eső fluoreszcencia intenzitásának csökkenése mutatja. Ezt a változást mind az ösztrogén, mind a szelektív ER agonistákkal való előkezelés kivédi. A neuroprotekción az ER α és az ER β hasonló mértékben vesz részt.

2. Az RP3V KP neuronjainak közel felén végződnek VP-IR rostok, hím és nőstény egerekben egyaránt. Ezek szuprakiazmatikus eredetét támasztja alá, hogy galanint nem tartalmaznak. Ezeken a KP sejteken PHA-L/VP kettősen jelölt appozíciókat is detektáltunk, mely szintén a VP rostok szuprakiazmatikus eredetét igazolja, továbbá erre utal az is, hogy a KP neuronokon eredményeink szerint a VP terminálisok szimmetrikus szinapszist képeznek, hasonlóan a GABAerg fenotípusú sejtekhez, mely kategóriához a SCN neuronjai is tartoznak. Kimutattuk, hogy nőstényekben az ösztrogén kezelés a KP neuronokon megnöveli a VP-IR kontaktusok számát.

3. A NKB-IR sejttestet nem tartalmazó RP3V-ben a KP sejtek közel 100%-a termel galanint. Ez az arány az ARC-ban 12%, míg ezen neuronok szinte mindegyike NKB immunreaktív. *In situ* hibridizációval a KP sejtek alig felében mutattunk ki galanin mRNS-t mind a két területen. A GnRH neuronokon kimutatott KP-IR kontaktusok 6%-ában találtunk galanin immunreaktivitást, 2%-ukban NKB-t. Az ösztrogén kezelés hatására a galanint az appozíciók szignifikánsan nagyobb hányadában (23%-ukban) mutattuk ki, míg a KP varikozitások NKB tartalma nem nőtt jelenős mértékben.

4. Férfi és női agy hipotalamuszában feltérképeztük a KP-IR struktúrák megoszlását, számos helyen detektáltunk sejttesteket illetve rostokat. Szignifikánsan több egységnyi területre eső rostot mutattunk ki nőkben a Pe és az Inf területén. Sejttestek vonatkozásában is robusztus nemek közti különbséget találtunk: míg a nők rostrális periventrikuláris régiójában markáns sejtcsoport látható, férfiaknál ezen régióban nem figyeltünk meg sejttesteket. Mindkét nemben a legtöbb KP sejttestet az Inf és az InfS területén mutattuk ki, nőkben hétszer többet, mint férfiakban.

A KP rostok és GnRH sejtek közt axoaxonális, axodendritikus és axosomatikus kontaktusokat mutattunk ki, női GnRH neuronok jelentősen nagyobb hányadán, mint a férfiakén.

A női infundibulumban a KP neuronok háromnegyede mutat NKB-IR-t. KP-IR rostok tizede mutat NKB immunreaktivitást a periventrikuláris régióban, míg a kolokalizáció mértéke ennek ötszöröse az Inf-ban.

Következtetések

1. *In vitro* vizsgálatainkból arra következtetünk, hogy az ösztrogén direkt neuroprotektív hatása a GnRH neuronokon is érvényesül. Az agonisták alacsony koncentrációja és az ER-ok nagy kötési affinitása alapján feltételezzük, hogy hatását a vizsgált ER altípusok közvetítik, hasonló mértékben védve a GnRH neuronokat az oxidatív stresszel szemben.

2. Morfológiai bizonyítékaink alátámasztják azt a hipotézist, hogy a RP3V KP neuronjai egy olyan multiszinaptikus neuronhálózat részét képezik, mely képes az ösztrogén-szint változásait észlelni és azt az SCN-ből származó cirkadián információval együtt a GnRH neuronok felé közvetíteni. A két információ konvergenciája a szabályos ivari ciklus és a GnRH surge kialakulásának alapfeltétele. Eredményeink szerint ez az útvonal az SCN VP-IR neuronjaiból ered. A VP-KP kontaktusok számát az ösztrogén megnöveli, melyből arra lehet következtetni, hogy ez a kapcsolat proösztrozus idején válik erősebbé, ami szükséges információ a surge pontos időzítéséhez. Hímekben VP-IR varikozitások a KP perikarionok beidegzése révén hozzájárulhatnak a GnRH expresszió hímekben is megfigyelhető diurnális szabályozásához.

3. Az ösztrogén negatív visszacsatolását közvetítő ARC-ban termelődő valamint a pozitív visszacsatolásban részt vevő RP3V-ben termelődő KP régió-specifikusan olyan neuropeptidekkel termelődik együtt illetve szabadulhat fel a GnRH neuronok közvetlen szomszédságában, melyek ösztrogén-függő módon illetve egyéb körülményektől befolyásoltan is hatással lehetnek a GnRH sejtek működésére.

Morfológiai adataink hozzájárulnak azon modell kiszélesítéséhez, mely összefoglalja a KP GnRH neuronokra kifejtett hatását. A modell az eddigi irodalmi adatok alapján feltételezi, hogy az ARC mag KP neuronjai elsősorban az eminentia mediana területén fejtik ki hatásukat a GnRH szekrécióra, mégpedig nem önmagukban, hanem más, szintén az ARC-ban termelődő neuropeptidekkel együttműködve. Eszerint alacsony ösztrogén szint mellett az ARC neuronjai egy autoregulációs mechanizmuson keresztül végső soron a GnRH terminálisok szomszédságában pulzatilis KP és NKB felszabaduláshoz vezet, mely pulzatilis GnRH szekréciót

eredményez. Magas ösztrogén szint mellett megnő a RP3V-ből a GnRH sejtestekre érkező KP/galanin input, ami a GPR54 és galanin receptorokon hatva, elősegíti a GnRH neuronok hosszabb aktiválásával a GnRH surge kialakulását. A GnRH sejtesteken kimutatott KP-NKB kettősen-jelölt appozíciók arra utalnak, hogy az ARC eredetű KP sejtek nem csak a GnRH terminálisokon, hanem a GnRH sejtesteken is kifejthetik hatásukat. Ennek jelentősége további vizsgálatokat igényel.

4. Emberi agyban a KP-IR struktúrák kiterjedt megoszlását detektáltuk, mely a KP sokrétű, a GnRH neuronok szabályozásán kívüli funkciójára enged következtetni. A KP rostok és GnRH sejtek közti kontaktusok nagy száma jelentős és sokrétű kommunikációt feltételez a kétféle rendszer közt. A KP sejtestek megoszlásának illetve rostjaik denzitásának nemek közti különbségei alapul szolgálhatnak a két nem reprodukzív tengelyének eltérő működéséhez. A KP-NKB nagymértékű kolokalizációja mind sejtestek, mind rostok szintjén arra enged következtetni, hogy a két neuropeptid együttesen felszabadulva is hatást gyakorolhat eddig még nem azonosított neuronokon.

A tézisek alapjául szolgáló közlemények

1. B Vida, L Deli, T Kalamatianos, E Hrabovszky, A Caraty, C W Coen, Z Liposits, I Kalló
Evidence for suprachiasmatic vasopressin neurons innervating kisspeptin neurons in the rostral periventricular area of the mouse brain: regulation by oestrogen
J Neuroendocrinol. 2010 Sep;22(9):1032-9.
IF 3.7
2. I Kalló, B Vida, L Deli, CS. Molnár, E Hrabovszky, A Caraty, P Ciofi, CW C, Z Liposits
Co-localisation of kisspeptin with galanin or neurokinin B in afferents to mouse GnRH neurones
J Neuroendocrinol 2011
IF 4.65
3. E Hrabovszky, P Ciofi, B Vida, MC Horvath, E Keller, A Caraty, SR Bloom, MA Ghattei, WS Dhillo, Z Liposits, I Kalló
The kisspeptin system of the human hypothalamus. Sexual dimorphism and relationship with gonadotropin-releasing hormone and neurokinin B neurons
Eur J Neurosci. 2010 Jun;31(11):1984-98.
IF 3.418

4. E Hrabovszky, CS Molnar, M Sipos, B Vida, P Ciofi, BA Borsay, L Sarkadi, L Herczeg, SR Bloom, MA Ghatei, WS. Dhillo, I Kalló, Z Liposits
Sexual dimorphism of kisspeptin and neurokinin B immunoreactive neurons in the infundibular nucleus of aged men and women
Front Genom Endocr 2011
IF 0 (2011-ben megjelent folyóirat)

A dolgozat témájában megjelent további publikáció

5. B Vida, E Hrabovszky, T Kalamatianos, C W Coen, Z Liposits, I Kalló
Oestrogen receptor alpha and beta immunoreactive cells in the suprachiasmatic nucleus of mice: distribution, sex differences and regulation by gonadal hormones.
J Neuroendocrinol. 2008 Nov; 20(11):1270-7.
IF 3.25
6. I Farkas, I Kalló, L Deli, B Vida, E Hrabovszky, C Fekete, SM Moenter, MWatanabe, Z Liposits
Retrograde Endocannabinoid Signaling Reduces GABA-ergic Synaptic Transmission to Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons
Endocrinology
IF 4.752

A dolgozat témáján kívül megjelent publikáció

7. I Kalló, C Jekkel, Hrabovszky, Z Jurányi, B Vida, A Járasi, T Wilhelm, LG Harsing Jr, Z Liposits
Immunohistochemical and *in situ* hybridization studies on glycine transporter 1 after transient ischemia in the rat forebrain.
Neurochem Int. 2008 Mar-Apr; 52(4-5):799-808.
IF 3.228

Összesített impact faktor: 23